

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/002356

International filing date: 08 February 2005 (08.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-39704
Filing date: 17 February 2004 (17.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 31 March 2005 (31.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

08. 2. 2005

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 2月17日
Date of Application:

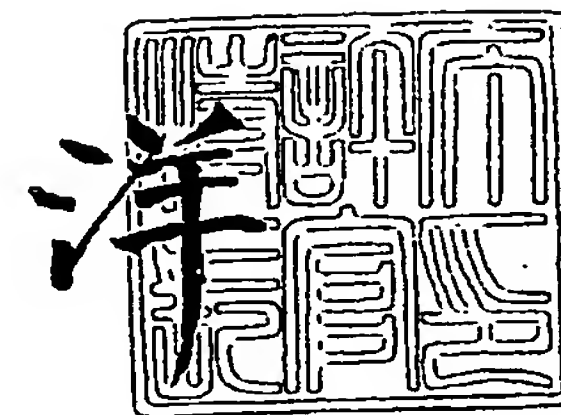
出願番号 特願2004-039704
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2004-039704]

出願人 森永乳業株式会社
Applicant(s):

2005年 3月18日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2005-3024214

【書類名】 特許願
【整理番号】 P-1287
【提出日】 平成16年 2月17日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C07K 1/18
C07K 1/30

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 食品
総合研究所内
【氏名】 市橋 信夫

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 栄養
科学研究所内
【氏名】 山内 恒治

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 栄養
科学研究所内
【氏名】 新 光一郎

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社 栄養
科学研究所内
【氏名】 安藤 哲也

【特許出願人】
【識別番号】 000006127
【氏名又は名称】 森永乳業株式会社

【代理人】
【識別番号】 100064908
【弁理士】
【氏名又は名称】 志賀 正武

【選任した代理人】
【識別番号】 100108578
【弁理士】
【氏名又は名称】 高橋 詔男

【選任した代理人】
【識別番号】 100089037
【弁理士】
【氏名又は名称】 渡邊 隆

【選任した代理人】
【識別番号】 100101465
【弁理士】
【氏名又は名称】 青山 正和

【選任した代理人】
【識別番号】 100094400
【弁理士】
【氏名又は名称】 鈴木 三義

【選任した代理人】
【識別番号】 100107836
【弁理士】
【氏名又は名称】 西 和哉

【選任した代理人】
【識別番号】 100108453
【弁理士】
【氏名又は名称】 村山 靖彦
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 008707
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 9909134

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

乳原料からラクトパーオキシダーゼを製造する方法であって、(1) イオン交換基として弱酸性基を有する陽イオン交換体に乳原料を接触させて吸着処理する工程、(2) 前記吸着処理の後、陽イオン交換体を洗浄処理する工程、(3) 前記洗浄処理の後、陽イオン交換体に溶出溶媒を接触させ、該溶出溶媒中にラクトパーオキシダーゼが溶出された溶出液を得る工程、(4) 前記溶出液を限外濾過膜で濃縮することにより、濃縮された溶出液中に沈澱を生成させる工程、および(5) 前記濃縮された溶出液から沈澱を除去してラクトパーオキシダーゼ溶液を得る工程を有することを特徴とするラクトパーオキシダーゼの製造方法。

【請求項 2】

前記陽イオン交換体におけるラクトフェリン吸着能が $85 \text{ mg} / 10 \text{ ml}$ 以上であることを特徴とする請求項 1 に記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。

【請求項 3】

前記イオン交換基がカルボキシメチル基であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。

【請求項 4】

前記(4) 工程において、前記濃縮された溶出液中の蛋白質含有量が $0.9 \sim 15\%$ となるように濃縮して沈澱を生成させることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。

【請求項 5】

前記(3) 工程で用いる溶出溶媒のイオン強度が $0.07 \sim 0.3$ であることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。

【請求項 6】

前記(3) 工程で用いる溶出溶媒が、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、および塩化マグネシウムからなる群から選ばれる 1 種又は 2 種以上の混合物からなる塩類の水溶液であることを特徴とする請求項 5 に記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。

【請求項 7】

さらに、前記(5) 工程で得られるラクトパーオキシダーゼ溶液の溶媒を除去することにより固体状のラクトパーオキシダーゼを得る工程を有することを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。

【請求項 8】

固体状のラクトパーオキシダーゼの純度が 80% 以上であることを特徴とする請求項 7 に記載のラクトパーオキシダーゼの製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】ラクトパーオキシダーゼの製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳原料から高純度のラクトパーオキシダーゼを製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ラクトパーオキシダーゼは、牛乳等の哺乳類の乳汁をはじめ、唾液、涙液、気道粘液等の分泌液に含有される酸化還元酵素である（例えば、非特許文献1）。ラクトパーオキシダーゼは、分子量約8万の蛋白質である。ラクトパーオキシダーゼは、補酵素として一分子当たり一つのヘムを含有している。このヘムの吸収ピークは412nmに存在するため、高度に精製したラクトパーオキシダーゼは茶色を呈している（例えば、非特許文献2）。

【0003】

ラクトパーオキシダーゼには、抗菌性、抗ウイルス活性、抗酸化活性、抗がん作用、免疫調節作用等の多様な生物機能が報告されており（例えば、非特許文献2～3）、生体防御に関与する蛋白質として極めて重要であることが明らかにされている。このようなラクトパーオキシダーゼの産業上の利用に関して、既にヘリコバクターピロリ感染の治療用医薬を製造するためのラクトペルオキシダーゼ、ペルオキシドドナーおよびチオシアネートの使用（例えば、特許文献1）、養殖水生動物の配合飼料に添加される病原菌感染予防及び治療剤（例えば、特許文献2）、老化防止剤（例えば、特許文献3）、肝機能改善剤（例えば、特許文献4）、ペルオキシダーゼの予防および治療への応用（例えば、特許文献5）、角膜障害治療剤（例えば、特許文献6）等に関する技術が開示されている。さらに、本出願人によってウレアーゼ不活性化組成物および飲食品（例えば、特許文献7）および腸内フローラ改善剤および飲食品（例えば、特許文献8）に関する技術が開示されている。

【0004】

実験室規模でのラクトパーオキシダーゼの精製法に関しては、非特許文献4～6にて報告されている。

その典型的な方法としては、塩酸等の酸を牛乳に添加してカゼインを等電点沈澱させ、上清であるホエーを調製する。得られたホエーを陽イオン交換体に接触させ、ホエー中で正に帯電しているラクトパーオキシダーゼを陽イオン交換体に吸着させる。次に陽イオン交換体を塩濃度の低い緩衝液で洗浄した後、塩濃度の高い緩衝液でラクトパーオキシダーゼを脱離させる方法が知られている。

実験室規模での精製法では、ラクトパーオキシダーゼの純度を高めるために、粒子径の小さなゲル状の陽イオン交換体を高密度に充填したカラムを用い、高圧ポンプで高速の通液を行う方法が一般的である（例えば、非特許文献6）。

これに対して、カラムに粒子径の比較的大きな陽イオン交換体を充填し、自然落下で通液を行う場合には、更に時間を要する（例えば、非特許文献4, 5）。

【0005】

近年の工業的規模における分離技術の進歩にともない、牛乳に含有される生理活性物質を高純度に分離・精製し、大量に製造することが可能になってきた。殆どの場合、実験室規模で最適化された蛋白質の精製法を、そのまま工業的規模にスケールアップする事は現実的には困難である。その要因として、実験室で汎用されるイオン交換体やカラムの特性が、必ずしも原料の大量処理には向いていないことが挙げられる。

また、乳原料への添加物の添加は、乳の風味および物性を変化させるので、乳原料からの蛋白質の精製には不都合である。さらに、陽イオン交換体の洗浄および陽イオン交換体からの蛋白質の脱離の目的で大量の添加物を使用した場合、精製された蛋白質からそれらの添加物を除去する必要があるため、製造法が複雑になる。

なお、乳原料からの高純度の蛋白質の製造における、これらの問題点を解決した製造法として、高純度牛ラクトフェリンの製造法（例えば、特許文献9）が当出願人によって既

出証特2005-3024214

に提案されている。

【0006】

ラクトパーオキシダーゼの工業的な製造方法については以下のものが開示されている。

特許文献10では、牛乳およびその派生物からラクトフェリンやラクトパーオキシダーゼ等の蛋白質を精製する方法が開示されており、陽イオン性の多糖類からなる陽イオン交換体に牛乳およびその派生物を接触させ、陽イオン交換体を低濃度の塩類溶液で洗浄した後、高濃度の塩類溶液で蛋白質の脱離を行う方法が公開されている。しかしながら、この特許文献に記載の方法で製造される蛋白質は混合物として得られるため、純度の高いラクトパーオキシダーゼの製造はできないという問題点を有していた。

【0007】

特許文献11では、活性の高いラクテニン画分の回収方法が開示されているが、この特許文献に記載の方法においても、ラクトパーオキシダーゼはラクテニンを構成する一成分として蛋白質の混合物の状態を得られるため、高純度のラクトパーオキシダーゼの製造は出来ないという問題点を有していた。

【0008】

特許文献12では、乳中の蛋白質を単離する方法として、金属キレート担体を使用した方法が開示されているが、この方法でも単離される蛋白質が免疫グロブリン、ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼから構成される混合物であるため、高純度のラクトパーオキシダーゼの製造は不可能であるという問題点を有していた。

【0009】

特許文献13では、牛乳あるいは牛乳誘導物から細胞増殖因子あるいは1種または2種以上の細胞増殖因子を含む組成物を回収する方法が開示されているが、この方法で得られる組成物は混合物であることから、高純度のラクトパーオキシダーゼ製造法ではないという問題点を有していた。

【0010】

特許文献14では、乳清からの金属蛋白質の選択的抽出法として、カルボキシル基またはスルホン酸基を備えたデキストランで被覆された無機の多孔性粒子（シリカ粒子）に乳清を接触させる工程を有する方法が開示されている。この方法で製造されたラクトパーオキシダーゼの純度は高くても50%程度であり、高純度のラクトパーオキシダーゼを製造するためには、さらに別の工程によって精製度を高める必要があるという問題点を有していた。

【0011】

特許文献15では、乳清からのラクトパーオキシダーゼおよびラクトフェリンの純粋な画分の抽出法が開示されている。この方法では、陽イオン交換体の容積変化によって起こる目詰まりの問題を解決する手段として、マイクロ濾過で処理した乳清が原料として使用されている。この方法には、乳清以外の乳原料が使用できないため、適応範囲が狭いという問題点を有していた。さらに、乳原料の前処理として、マイクロ濾過も必要とされており、製造工程が複雑である。また、陽イオン交換体には、強陽イオン交換体を使用されており、ラクトパーオキシダーゼおよびラクトフェリンは、それぞれ塩濃度の異なる緩衝液によって選択的に陽イオン交換体から脱離される。この方法では、陽イオン交換体の洗浄と、蛋白質の選択的脱離を可能にするため、用いる緩衝液のpHを調整する必要があり、かかる緩衝液を調製するためには多量の添加物を必要とする。また、精製された蛋白質から添加物を除去する必要があり、さらに工程を複雑化させる要因となるというような様々な問題点を有していた。

【0012】

特許文献16では、強陽イオン性のスルホン基を導入した多糖類アフィニティ担体を陽イオン交換体として使用した鉄結合性蛋白質の分離精製法が開示されている。この方法では、比較的高純度（純度85%）のラクトパーオキシダーゼが製造される。しかし、吸着処理後の陽イオン交換体の洗浄工程において、pH5以下に調整された緩衝液による洗浄処理が必須である。また、ラクトパーオキシダーゼおよびラクトフェリンの選択的脱離に

は、それぞれ塩濃度の異なる pH 5 以下の緩衝液が必要であった。

【0013】

特許文献 17 では、乳原料からの生理活性物質の製造法として、スルホン基を持つ強陽イオン交換体と、カルボキシル基を持つ弱陽イオン交換体のどちらでも使用可能な技術が開示されている。しかしながら、この方法においても、やはり吸着処理後の陽イオン交換体の洗浄と、ラクトパーオキシダーゼの選択的脱離を可能にするために pH 5 以下の緩衝液が必要であるという問題点を有していた。

【0014】

特許文献 18 では、乳および乳製品からのラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの精製法が開示されている。この特許では、乳および乳製品を高流速で通液することを可能とするために、陽イオン交換体として、粒子径が大きく、物理的に安定性の高いゲルが使用されているが、この方法においても、吸着処理後の陽イオン交換体の洗浄とラクトパーオキシダーゼの選択的脱離のためには、緩衝液の使用による pH の調整が必要であるという問題点を有していた。

なお、この特許で製造されるラクトパーオキシダーゼはその純度に関する記述がないことから、高純度のラクトパーオキシダーゼの製造が可能であるかどうかについては不明である。

【0015】

上記した各特許文献および非特許文献は以下のとおりである。

【特許文献 1】特表 2000-509367 号公報

【特許文献 2】特許第 3103615 号公報

【特許文献 3】特許第 3103167 号公報

【特許文献 4】特開 2001-226289 号公報

【特許文献 5】特表平 6-501453 号公報

【特許文献 6】特許第 2840795 号公報

【特許文献 7】特開 2002-238554 号公報

【特許文献 8】特開 2003-246753 号公報

【特許文献 9】特公平 6-13560 号公報

【特許文献 10】米国特許第 4667018 号明細書

【特許文献 11】特許第 2985158 号公報

【特許文献 12】欧州特許第 0518448 号明細書

【特許文献 13】特許第 3403066 号公報

【特許文献 14】特許第 2710283 号公報

【特許文献 15】特許第 2553180 号公報

【特許文献 16】特許第 2686831 号公報

【特許文献 17】特開平 5-202098 号公報

【特許文献 18】米国特許第 5596082 号公報

【非特許文献 1】アメリカン・ジャーナル・オブ・レスピラトリー・アンド・クリティカル・ケア・メディスン (American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine)、アメリカ、第 166 巻、2002 年、p. S57~S61

【非特許文献 2】ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ニュートリション (British Journal of Nutrition)、イギリス、第 84 巻、2000 年、p. S19~S25

【非特許文献 3】ライフ・サイエンス (Life Sciences)、イギリス、第 43 巻、1988 年、p. 739~745

【非特許文献 4】アクタ・ケミカ・スカンジナビカ (Acta Chemica Scandinavica)、デンマーク、第 23 巻、1969 年、p. 171~184

【非特許文献 5】フェブス・レターズ (FEBS Letters)、オランダ、第 110 巻、1980 年、p. 200~204

【非特許文献 6】ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー (Journal of Chromatography)、オランダ、第 795 巻、1998 年、p. 277~287

出証特 2005-3024214

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

上述のように、従来のラクトパーオキシダーゼの製造方法のほとんどにおいては、乳原料から回収されたラクトパーオキシダーゼは他の蛋白質との混合物として得られ、その純度は十分に高いとは言えなかった。また、ラクトパーオキシダーゼの純度を高めるためには、別の精製工程が必要であり、そのための時間と製造コストが必要であった。

また、ラクトパーオキシダーゼの純度が比較的高くなる製造方法であっても、乳原料に含まれるラクトパーオキシダーゼの選択的吸着、陽イオン交換体の洗浄、蛋白質の選択的脱離等を行うために、各工程でpHを調整する必要がある、これによって多量の添加物の使用が必要であるという問題点も含まれていた。

【0017】

本発明は前記事情に鑑みてなされたもので、添加物の使用による乳原料の組成および品質の変化を防止しつつ、従来より簡単な工程で、より短時間に、より低コストで、純度の高いラクトパーオキシダーゼを製造することができ、また工業的規模での製造にも適用することができるラクトパーオキシダーゼの製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、イオン交換法と限外濾過膜法を用いた処理工程を行うことにより、製造工程全体をとおしてpH調整を行わずに、乳原料から直接、高純度のラクトパーオキシダーゼを工業的に製造できる方法を見出し、本発明を完成するに至った。

【0019】

すなわち本発明のラクトパーオキシダーゼの製造方法は、乳原料からラクトパーオキシダーゼを製造する方法であって、(1)イオン交換基として弱酸性基を有する陽イオン交換体に乳原料を接触させて吸着処理する工程、(2)前記吸着処理の後、陽イオン交換体を洗浄処理する工程、(3)前記洗浄処理の後、陽イオン交換体に溶出溶媒を接触させ、該溶出溶媒中にラクトパーオキシダーゼが溶出された溶出液を得る工程、(4)前記溶出液を限外濾過膜で濃縮することにより、該濃縮された溶出液中に沈澱を生成させる工程、および(5)前記濃縮された溶出液から沈澱を除去してラクトパーオキシダーゼ溶液を得る工程を有することを特徴とする。

【0020】

前記陽イオン交換体におけるラクトフェリン吸着能が $85\text{mg}/10\text{ml}$ 以上であることを好ましい態様とする。

前記イオン交換基がカルボキシメチル基であることを好ましい態様とする。

前記(4)工程において、溶出液中の蛋白質含有量が $0.9\sim 15\%$ となるように濃縮して沈澱を生成させることを好ましい態様とする。

前記(3)工程で用いる溶出溶媒のイオン強度が $0.07\sim 0.3$ であることを好ましい態様とする。

前記(3)工程で用いる溶出溶媒が、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、および塩化マグネシウムからなる群から選ばれる1種又は2種以上の混合物からなる塩類の水溶液であることを好ましい態様とする。

さらに、(6)前記(5)工程で得られたラクトパーオキシダーゼ溶液の溶媒を除去することにより固体状のラクトパーオキシダーゼを得る工程を有することを好ましい態様とする。

前記(6)工程で得られる固体状のラクトパーオキシダーゼの純度が 80% 以上であることを好ましい態様とする。

【発明の効果】

【0021】

本発明にあつては、陽イオン交換体に吸着されたラクトパーオキシダーゼを溶出溶媒中

に溶出させる際には、ラクトパーオキシダーゼを他の画分（不純物）と混合された状態で得、この後、限外濾過膜を用いて濃縮する際に、溶解度の差異によって他の画分（不純物）を選択的に分離・除去することによって高純度のラクトパーオキシダーゼを得ることができる。

したがって、本発明によれば、以下のような効果が得られる。

(1) pH調整を必要とする工程を経ずにラクトパーオキシダーゼを選択的に回収することができる。

(2) 簡単な工程により、より短時間に、より低コストで高純度のラクトパーオキシダーゼを製造することができる。

(3) 緩衝液や多量の添加物を必要としないことから、低コスト化の点で有利である。

(4) 添加物の使用による乳原料の組成および品質の変化を防止することができる。

(5) 工業的スケールに容易に適用することができる。

(6) 陽イオン交換体に接触させる原料として乳清以外の乳原料も広く適用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

次に、本発明の好ましい実施態様について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の好ましい実施態様に限定されず、本発明の範囲内で自由に変更することができるものである。

なお、本明細書における蛋白質含有量については、試料中の窒素含有量をケルダール法で測定し、窒素/蛋白質換算係数6.38を用いて換算した百分率として表示した。

また、ラクトパーオキシダーゼの純度については、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析し、試料中の蛋白質に由来する全ピーク面積に対する、ラクトパーオキシダーゼのピーク面積の百分率として表示した。

本明細書において、上記蛋白質含有量および純度以外の百分率は特に断りのない限り質量による表示である。

【0023】

本発明で用いることのできる乳原料としては、少なくともラクトパーオキシダーゼが含まれていなければならないものも使用することができる。例えば、ヒト、ウシ、水牛、ヒツジ、ヤギ、ウマ等の哺乳類由来の、乳、脱脂乳、ホエー等を用いることができる。なかでも熱処理条件の緩やかなものや未加熱のものを用いることが好ましい。また、脱脂粉乳、全脂粉乳、ホエー粉、ホエー蛋白質濃縮物（WPC）、ホエー蛋白質分離物（WPI）等を水又は緩衝液に溶解させた溶液も使用できる。さらに、等電点沈澱によってカゼインを除去したり、レンネットによってカゼインを排除した上清、或いはチーズ製造時に排出されるチーズホエーも使用することができる。これらの乳原料は、予めクラリファイヤー、マイクロフィルトレーション、濾過等の操作によって沈澱物を除去しなくてもよい。

本発明において、特に、乳原料としてウシ由来の乳原料を用いてウシラクトパーオキシダーゼを製造することが好ましい。

【0024】

(1) まず、乳原料を陽イオン交換体に接触させて吸着処理を行う。陽イオン交換体としては、イオン交換基として弱酸性基を有するものが用いられる。弱酸性のイオン交換基としては、カルボキシル基、カルボキシメチル基等が挙げられる。好ましくはカルボキシメチル基である。

好ましい陽イオン交換体の例としては、架橋型多糖類（アガロース、デキストラン、セルロース等）、親水性シリカゲル、合成ポリマー等からなる多孔性粒子に弱酸性のイオン交換基を導入したもの等が挙げられる。具体例としては、セパビーズFPC-M13（三菱化成社製、イオン交換基：カルボキシメチル基）や、CM-セファデックスC-50（アマシャム社製、イオン交換基：カルボキシメチル基）を好適に用いることができる。

【0025】

ここで、ラクトパーオキシダーゼの回収率を高めるためには、後の工程において、吸着

処理後の陽イオン交換体に溶出溶媒を接触させたときに、陽イオン交換体に吸着された蛋白質が容易に脱離されて該溶出溶媒中に溶出することが好ましい。したがって、本発明においては、乳原料中の蛋白質の陽イオン交換体への結合が強すぎない方が好ましい。イオン交換基として強酸性基を有する陽イオン交換体は広いpH範囲で解離しているのに対し、イオン交換基として弱酸性基を有する陽イオン交換体はpHに依存して電荷が変化するため、蛋白質の結合能も変化するという特性を持つので、本発明の製造方法において好適である。

【0026】

また、本発明で用いられる陽イオン交換体の多孔性または吸着性のスケールは、ラクトパーオキシダーゼとほぼ同じ等電点と分子量を持つラクトフェリンに対する吸着能を指標として表すことができる。陽イオン交換体のラクトフェリンに対する吸着能は、例えば特公平6-13560号公報に記載された方法で求めることができる。

すなわち、ナトリウム形の陽イオン交換体を水で膨潤させて10mlとしたものを、未加熱の脱脂乳1kg (pH6.7) 中に投入し、これらの混合液を4℃で16時間攪拌した後、陽イオン交換体を分取して水洗する。水洗した陽イオン交換体を濃度10%の食塩水150mlに接触させ、陽イオン交換体から食塩水中にラクトフェリンを溶出させ、この回収液中のラクトフェリン含量をローリー法〔アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、アメリカ、第15巻、1966年、p. 45~52〕により測定することによって吸着能 (単位: mg/10ml) を算出する。

上記方法で測定されるラクトフェリン吸着能が高い陽イオン交換体を選択することにより、本発明の方法によるラクトパーオキシダーゼの回収量を高めることができる。一般的に、牛乳中のラクトフェリン含有量は約100mg/L程度であることから、本発明において用いられる陽イオン交換体の上記ラクトフェリン吸着能は85mg/10ml以上であることがより好ましく、該吸着能の値が高い方がより好ましい。

具体的に、上記で挙げたセパビーズFP-CM13のラクトフェリン吸着能は85mg/10ml、CM-セファデックスC-50のラクトフェリン吸着能は91mg/10mlであり、いずれも高いラクトフェリン吸着能を示す陽イオン交換体である。

【0027】

乳原料と陽イオン交換体との吸着処理 (接触) は、バッチ式攪拌法、カラム連続法等の方法で行うことができ、乳原料と陽イオン交換体を十分に接触させることができれば、いずれも実施可能である。

バッチ式の場合、一定量の乳原料から多くの収量を望む場合には多くの陽イオン交換体を用い、一定量の陽イオン交換体で多くの収量を望む場合には多くの乳原料を用いることが適当である。バッチ式における乳原料と陽イオン交換体の混合体積比率は、陽イオン交換体の吸着能や具体的な吸着処理方法に応じて任意に調整することができる。

【0028】

ここで、陽イオン交換体の特性は、硬質タイプと軟質タイプの2つに大きく区分されるが、本発明ではいずれのタイプも使用可能である。

硬質タイプは、イオン強度またはpHによってイオン交換体自身の体積はほとんど変化せず、また流速の変化などにより陽イオン交換体にかかる圧力が変化しても陽イオン交換体自体の体積はほとんど変わらない。したがって、硬質タイプは、陽イオン交換体をカラム内に保持して高流速で通液するカラム連続法により適している。

一方、軟質タイプの陽イオン交換体はイオン強度またはpHによってイオン交換体自身の体積が大きく変化し、また流速の変化などにより陽イオン交換体にかかる圧力が変化すると陽イオン交換体自体の体積が容易に変化する。そのため、軟質タイプの陽イオン交換体をカラム内に保持して高流速で通液することは困難であり、特に脱脂乳やホエー等を通液する時は他の塩類溶液等を通液する時に比べて陽イオン交換体層内で大きな圧力損失が生じる。したがって、軟質タイプの陽イオン交換体は、もっぱらバッチ法に適している。

なお、前記のセパビーズFP-CM13 (三菱化成社製) は硬質タイプであり、CM-セファデックスC-50 (アマシャム社製) は軟質タイプである。

【0029】

乳原料と陽イオン交換体を吸着処理させる温度は0～60℃の範囲で行われることが望ましい。0℃未満では乳原料の凍結や、粘度上昇などが生じる恐れがあり、60℃を超える場合はラクトパーオキシダーゼが変性する可能性があるためである。また未殺菌の乳原料を使用する場合は、細菌の繁殖を防ぐため、0～10℃で実施することが望ましい。

【0030】

乳原料と陽イオン交換体の吸着処理時間（接触時間）については、吸着処理時の温度、採用する吸着処理方式（バッチ式またはカラム連続法）等を勘案して適宜条件を選択することができる。

【0031】

(2) 次に、吸着処理後の陽イオン交換体を洗浄処理する。このときの洗浄液としては、イオン強度が0.07未満と低い塩類水溶液、又は中性若しくは弱酸性領域の緩衝液を用いることも可能であるが、製造コストの面から考慮すると水で洗浄することが好ましい。

【0032】

(3) 次いで、洗浄処理を終えた陽イオン交換体に溶出溶媒を接触させる。これにより、陽イオン交換体から該溶出溶媒中にラクトパーオキシダーゼを溶出させて溶出液を得る。この工程で使用する溶出溶媒は、イオン強度が0.07以上0.3以下の範囲のものが好ましい。イオン強度が上記範囲の溶出溶媒を用いることにより、陽イオン交換体からラクトパーオキシダーゼを効率良く溶出させることができる。

該溶出溶媒としては、イオン強度を上記の範囲に調整した中性又は弱酸性領域の緩衝液を用いることもできるが、製造コストの面から考慮すると塩類のみを溶解した水溶液（塩類溶液）を用いることがより好ましい。

好ましい塩類溶液は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、および塩化マグネシウムからなる群から選ばれる1種又は2種以上の混合物からなる塩類の水溶液である。

【0033】

(4) 次に、得られた溶出液に対して、限外濾過膜を用いた膜分離法によって膜処理を行う。これによって溶出液を濃縮し、該溶出液中に沈澱を生成させる。

限外濾過膜の運転方法は、水および分画分子量以下の分子量を有する成分を透過させて除去する通常の限外濾過法と、膜を透過した透過液と等量の水を、膜上の保持液に添加しながら連続運転する流水濾過法（ダイアフィルトレーション）の2つに区分されるが、本発明においてはいずれの方法も使用できる。特に、後者の流水濾過法は、濃縮と同時に脱塩処理を行うことができるとともに、保持液からの低分子量成分を高度に除去できる点でより好ましい。

なお、前者の通常の限外濾過法を用いた場合には、限外濾過の後に、透析やゲル濾過等の方法で脱塩処理を行うことが好ましい。

【0034】

限外濾過膜は、一般に市販されている限外濾過膜であれば何れも使用できる。具体例としては、IRIS3038膜およびIRIS3072膜（いずれもローヌ・プーラン社製）、あるいはGR-61pp膜（DDS社製）などが挙げられる。

限外濾過膜の材質は有機材料製又は無機材料製の何れであっても使用可能であり、コスト面、汎用性等を考慮して選択すればよい。

限外濾過処理時の溶出液の温度は、使用する膜の耐熱温度以下であれば（例えばGR-61pp膜なら80℃以下）実施可能である。ただし60℃以上ではラクトパーオキシダーゼが熱変性する可能性があり、また10～60℃の範囲では微生物の繁殖が著しいことから、0～10℃の範囲で行うことが好ましい。

限外濾過時の圧力は、使用する膜の耐圧限界以下であれば（例えばGR-61pp膜なら0.6MPa以下）いずれの圧力でも可能である。尚、耐圧限界値付近での使用は膜の寿命を縮める可能性があるため、耐圧限界の2/3以下（例えばGR-61pp膜なら0.4MPa以下）で行うことが好ましい。

使用する限外濾過膜モジュールは、管型、中空糸型、平膜型、スパイラル型などいずれの形式でも可能である。ただし、中空糸型内圧式等のモジュールでは、中空糸内に沈澱物が生成した場合に流路閉塞を起こす可能性があるため、圧力等を考慮して行うことが好ましい。

【0035】

前段の(3)工程において得られる溶出液は、茶色の清澄な溶液である。そして、この溶出液に対して限外濾過膜による濃縮を行うと、蛋白質の溶解性の違いから、限外濾過膜上の保持液中において、ラクトパーオキシダーゼ以外の蛋白質が沈澱を形成する。ここで、ラクトパーオキシダーゼ以外の蛋白質、すなわち、不純物としての蛋白質を効率良く沈澱させるためには、濃縮後の溶出液中における蛋白質含有量が0.9%以上となるように濃縮することが好ましい。尚、溶出液中における蛋白質含有量が15%を越えると溶出液の粘性が上昇し、限外濾過膜処理の効率が低下する恐れがあることから、濃縮後の溶出液の蛋白質含有量は0.9~15%の範囲内であることがより好ましい。

沈澱を生成させるまでの各工程の条件等を整えることにより、沈澱中に混入するラクトパーオキシダーゼの量を低減させることができ、ラクトパーオキシダーゼを全く含まない沈澱を生成させることも可能である。

【0036】

(5) 次に、沈澱が生成した溶出液(保持液)から沈澱を除去する。これにより溶出液から不純物としての蛋白質を除去して、高純度のラクトパーオキシダーゼを含有する溶液(ラクトパーオキシダーゼ溶液)を得る。

沈澱の除去方法は、沈澱が生成した溶出液(保持液)を静置して沈澱物を回収する方法でもよく、あるいは遠心分離や、精密濾過(マイクロフィルトレーション)等による清澄化処理を行うことによって、沈澱物が除去された清澄化処理液(ラクトパーオキシダーゼ溶液)を回収する方法でもよい。

この工程で得られたラクトパーオキシダーゼ溶液は、必要に応じて殺菌処理を行うことが好ましい。その際、ラクトパーオキシダーゼの熱安定性を高めるという観点から、塩化カルシウムなどのカルシウムイオンを20mM程度の濃度になるように添加し、72℃で、15~90秒程度の時間、加熱殺菌することにより殺菌処理を行うことが好ましい。

【0037】

(6) この後、得られたラクトパーオキシダーゼ溶液の溶媒を除去することにより固体状のラクトパーオキシダーゼを得ることができる。

溶媒を除去する方法は、特に限定されず、例えば限外濾過膜を用いてさらに濃縮した後、常法により凍結乾燥して水分を除去する方法を好適に用いることができる。これにより高純度のラクトパーオキシダーゼ粉末を製造することができる。

このようにして得られる固体状のラクトパーオキシダーゼは、純度80%以上の高純度を達成することができる。

なお、(6)溶媒を除去する工程は必須ではなく、高純度ラクトパーオキシダーゼとして、(5)工程で得られたラクトパーオキシダーゼ溶液を溶液の状態で用いることもできる。

【実施例】

【0038】

次に試験例を示して本発明を詳細に説明する。

【試験例1】

本試験は、弱酸性陽イオン交換体から回収した溶出液を限外濾過膜で濃縮し、沈澱を生成させる(4)工程において、濃縮液中で沈澱を生成するのに好ましい条件を検討するために行った。

(1) 試料

弱酸性陽イオン交換体として、カルボキシメチル基を有し、ラクトフェリン吸着能が91mg/10mlであるCM-セファデックスC-50(アマシャム社製)を用いた。該弱酸性陽イオン交換体170mlを充填したカラムに、脱脂乳20リットルを添加し

て蛋白質を吸着させた。次いで、カラム内の弱酸性陽イオン交換体を水洗した後、カラム内に溶出溶媒として1.6%食塩水（イオン強度0.27）200mlを添加することにより、弱酸性陽イオン交換体に吸着された蛋白質を該食塩水中に溶出させた。回収した約200mlの溶出液を試験試料とした。尚、得られた試験試料中の蛋白質含有量をケルダール法によって測定したところ、0.26%であった。

【0039】

(2) 試験方法

3種の遠心分離式限外濾過フィルターユニット（分画分子量：1万ダルトン、3万ダルトン、及び5万ダルトン。いずれもミリポア社製）を用意した。

それぞれのフィルターユニットに試験試料0.5mlを添加し、毎分6,000回転で遠心分離して限外濾過を行い、沈澱生成の有無を観察した。その際、遠心分離の時間をコントロールすることによって、フィルターユニット内の保持液の体積を段階的に変化させた。

(3) 試験結果

本試験の結果、分画分子量が異なる3種のフィルターユニットのいずれにおいても、フィルターユニット内の保持液の体積が0.15mlに濃縮された場合に、フィルターの上に白色の沈澱が観察された。保持液の体積が0.15ml以下の場合にも沈澱の生成が観察されたが、0.15ml以上では沈澱の生成は全く観察されなかった。

また、保持液の体積が0.15mlに濃縮されたときの、該保持液中における全蛋白質含有量は0.9%であった。

このことから、濃縮後の保持液の全蛋白質含有量が0.9%以上となるように濃縮すると、保持液中に沈澱が生成されることが認められた。

【0040】

[試験例2]

本試験は、限外濾過膜を用いた濃縮によって生成された沈澱の溶解性に及ぼす脱塩処理の影響を検討するために行った。

(1) 試料

本試験の試料は、試験例1と同様の試験試料（1.6%食塩水に蛋白質を溶出させた溶出液、蛋白質含有量：0.26%）を使用した。

(2) 試験方法

分画分子量3万ダルトンの限外濾過膜を装着した攪拌式セルユニット（ミリポア社製）を3つ用意し、それぞれのセルユニットに試験試料50mlを添加した。窒素ガスを用いて、セルユニット内が約0.3MPaとなるように加圧し、セルユニット内の該保持液が10mlになるまで濃縮した。

一つ目のセルは、保持液が10mlになったところで、セルユニット内の保持液全量を遠心チューブに移し、毎分10,000回転で遠心分離することによって固液分離し、沈澱（沈澱試料1）を回収した。

二つ目のセルは、保持液が10mlになったところで、セルユニット内の保持液全量を遠心チューブに移し、毎分10,000回転で遠心分離することによって固液分離し、沈澱を回収した。この沈澱に10mlの精製水を添加し、ボルテックスミキサーで1分間攪拌した。こうして得られた沈澱懸濁液を遠心チューブに移し、さらに毎分10,000回転で遠心分離することによって固液分離し、沈澱（沈澱試料2）を回収した。

三つ目のセルは、保持液が10mlになるまで濃縮されたセルユニット内に、精製水40mlを添加し、前回と同様に加圧しながら、再び保持液が10mlになるまで濃縮した。保持液が10mlになったところで、このセルユニット中の保持液全量を遠心チューブに移し、毎分10,000回転で遠心分離することによって固液分離し、沈澱（沈澱試料3）を回収した。

沈澱試料1～3の乾燥重量を常法により測定した。

【0041】

(3) 試験結果

本試験の結果、いずれのセルにおいても、セルユニット内の保持液が 10 ml になった状態で保持液中には沈澱が形成されていた。

また、沈澱試料 1、沈澱試料 2、および沈澱試料 3 の質量に殆ど差は無かった。したがって、濃縮工程により一旦生成された沈澱に精製水を添加しても、沈澱は再溶解しないことが確認された。

また、溶出液中で一旦生成された沈澱は、脱塩処理により塩濃度が変化してもその影響を受けず、沈澱は再溶解しないことが認められた。

【0042】

次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

(実施例 1)

弱酸性陽イオン交換体として、カルボキシメチル基を有し、ラクトフェリン吸着能が 9 mg/10 ml である CM-セファデックス C-50 (アマシャム社製) を用意した。

この陽イオン交換体 17 リットルを内径 50 cm のカラムに充填し、該カラムに 1.5 % 食塩水 40 リットルを通液した後、水洗してカラム内の陽イオン交換体をナトリウム形に調製した。

乳原料としてウシ由来の脱脂乳 (pH 6.7、後述の試料 1) を用意した。この脱脂乳 2000 リットルを温度 4℃、流速 60 リットル/h の条件で上記カラムに通液して吸着処理を行った。

吸着処理後のカラムに水を通液して、陽イオン交換体に非特異的に吸着した乳成分を洗浄処理した。

次いで、溶出溶媒として 1.6 % 食塩水 (イオン強度 0.27) 20 リットルを 30 リットル/h の流速で通液し、陽イオン交換体に吸着した蛋白質の溶出処理を行った。これにより、ウシラクトパーオキシダーゼを含む溶出液 (後述の試料 2) 21 リットルを回収した。

【0043】

次に、溶出液 21 リットルを分画分子量 2 万の限外濾過膜 (DDS 社製) ユニットを用いて平均圧力 0.3 MPa で限外濾過し、保持液量が 2 リットルになるまで濃縮を行った。

この後、水を添加しながらさらに限外濾過することにより保持液を脱塩処理し、最終的に 2 リットルの保持液を回収した。保持液中には白色の沈澱が生成していた。

次いで、白色の沈澱を含む保持液を静置して清澄化し、上清画分 (後述の試料 3) 1.95 リットルをウシラクトパーオキシダーゼ溶液として回収した。

回収した上清画分 (ウシラクトパーオキシダーゼ溶液) に対して、ポアサイズ 1.4 μ m の精密濾過膜を用いたマイクロフィルトレーションを行って、さらに微量の沈澱物を除去し、ウシラクトパーオキシダーゼを含む精製標品を製造した。

さらに、得られた精製標品を凍結乾燥し、ウシラクトパーオキシダーゼを含む粉末状の凍結乾燥標品 (後述の試料 4) 26 g を製造した。

【0044】

製造工程中に得られた前記試料 1~4、すなわち脱脂乳 (乳原料) : 試料 1、陽イオン交換体からの溶出液 : 試料 2、限外濾過膜処理後の保持液の上清画分 : 試料 3、凍結乾燥標品 : 試料 4 について、それぞれ蛋白質含有量及びウシラクトパーオキシダーゼ活性を測定し、比活性を求めた。ここで、蛋白質含有量はケルダール法により測定し、ウシラクトパーオキシダーゼ活性はピュッターらの方法 [バーグマイヤー (Bergmeyer) 編、メソッズ・オブ・エンザイマチック・アナリシス (Methods of Enzymatic Analysis) 第 3 版、第 3 巻、1983 年、p. 286~293] で測定し、蛋白質 1 mg 当たりのパーオキシダーゼ活性 (比活性) を求めた。その結果を表 1 に示す。

【0045】

【表1】

試料	蛋白質含有量(%)	比活性(unit/mg)
試料1	3.30	0.2
試料2	0.26	132.5
試料3	1.64	220.3
試料4	92.30	224.4

【0046】

表1に示すように、試料1の蛋白質含有量は3.30%であり、比活性は0.20 unit/mgであった。また、試料2の蛋白質含有量は0.26%、比活性は132.5 unit/mgであった。これらの結果より、脱脂乳(乳原料)中の蛋白質のうち、ウシラクトパーオキシダーゼが選択的に溶出液中に溶出されたことがわかる。

また、試料3の蛋白質含有量は1.64%、比活性は220.3 unit/mgであり、試料4の比活性は224.4 unit/mgであった。

試料2と試料3、4の結果を比較すると、溶出液を限外濾過膜を用いて濃縮し、生成した沈澱物を除去することによって、ウシラクトパーオキシダーゼの比活性が格段に高まっている。このことから、かかる沈澱物の除去によりウシラクトパーオキシダーゼ以外の不純物としての蛋白質が効果的に除去され、ウシラクトパーオキシダーゼの精製効率が向上していることがわかる。

【0047】

また、前記試料4(凍結乾燥標品)について、ラクトパーオキシダーゼの純度を高速液体クロマトグラフィーにて分析した。

この分析には、Shodex Asahipak C4P-50カラム、および測定波長280nmの紫外部吸収検出器を装備したHPLC装置を用いた。移動相は、流速0.8ml/minであり、A液(トリフルオロ酢酸0.03%を含む、アセトニトリル:0.5M塩化ナトリウム=10:90の混合液)およびB液(トリフルオロ酢酸0.03%を含む、アセトニトリル:0.5M塩化ナトリウム=50:50の混合液)について、30分間でA:B=50:50→A:B=0:100の濃度変化とする直線濃度勾配法により溶出を行った。試料は約20mg秤量し、2.9%塩化ナトリウム水溶液10mlに溶解して、その25μlを前記分析方法にて試験した。

ここで、予め標準品として精製ウシラクトパーオキシダーゼ(シグマ社製)を使用し、前記分析方法で標準品のピークが溶出時間約18分であることを確認した。

続いて、前記分析方法で試料4を分析し、ウシラクトパーオキシダーゼ純度をピーク面積の自動積分法により測定した。

その結果、試料4のウシラクトパーオキシダーゼ純度は89%であることが確認された。したがって、本発明の方法により、乳原料から高純度にラクトパーオキシダーゼを製造できることが確認された。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来より簡単な工程で、より短時間に、より低コストで、純度の高いラクトパーオキシダーゼを製造することができ、また工業的規模での製造にも適用することができるラクトパーオキシダーゼの製造方法を提供する。

【解決手段】 乳原料からラクトパーオキシダーゼを製造する方法であって、(1) イオン交換基として弱酸性基を有する陽イオン交換体に乳原料を接触させて吸着処理する工程、(2) 前記吸着処理の後、陽イオン交換体を洗浄処理する工程、(3) 前記洗浄処理の後、陽イオン交換体に溶出溶媒を接触させ、該溶出溶媒中にラクトパーオキシダーゼが溶出された溶出液を得る工程、(4) 前記溶出液を限外濾過膜で濃縮することにより、該濃縮された溶出液中に沈澱を生成させる工程、および(5) 前記濃縮された溶出液から沈澱を除去してラクトパーオキシダーゼ溶液を得る工程を有することを特徴とするラクトパーオキシダーゼの製造方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号 特願 2004-039704
受付番号 50400252611
書類名 特許願
担当官 第五担当上席 0094
作成日 平成16年 2月18日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000006127
【住所又は居所】 東京都港区芝5丁目33番1号
【氏名又は名称】 森永乳業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】 100064908

【住所又は居所】 東京都中央区八重洲2丁目3番1号 志賀国際特
許事務所

【氏名又は名称】 志賀 正武

【選任した代理人】

【識別番号】 100089037

【住所又は居所】 東京都中央区八重洲2丁目3番1号 志賀国際特
許事務所

【氏名又は名称】 渡邊 隆

【選任した代理人】

【識別番号】 100101465

【住所又は居所】 東京都中央区八重洲2丁目3番1号 志賀国際特
許事務所

【氏名又は名称】 青山 正和

【選任した代理人】

【識別番号】 100094400

【住所又は居所】 東京都中央区八重洲2丁目3番1号 志賀国際特
許事務所

【氏名又は名称】 鈴木 三義

【選任した代理人】

【識別番号】 100107836

【住所又は居所】 東京都中央区八重洲2丁目3番1号 志賀国際特
許事務所

【氏名又は名称】 西 和哉

出証特 2005-3024214

【選任した代理人】

【識別番号】 100108453

【住所又は居所】 東京都中央区八重洲 2 丁目 3 番 1 号 志賀国際特
許事務所

【氏名又は名称】 村山 靖彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100108578

【住所又は居所】 東京都中央区八重洲 2 丁目 3 番 1 号 志賀国際特
許事務所

【氏名又は名称】 高橋 詔男

特願 2004-039704

出願人履歴情報

識別番号

[000006127]

1. 変更年月日

1990年 9月 6日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都港区芝5丁目33番1号

氏名

森永乳業株式会社